Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 4, 2024, p. 363-379

Studying the Combination Effect of Celery, *Apium graveolens* Extracts with *Bt*, Against Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella*

D. Mohammadi [1*], A. Hatami [2], N. Eivazian Kary [1], R. Farshbaf Pourabad [3]

١- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
(*- Corresponding Author Email: mohamadi@azaruniv.ac.ir)
2- Ph.D. Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ege University, 35100 Izmir, Turkiye

Received: 19-03-2023 Revised: 25-07-2023 Accepted: 25-07-2023 Available Online: 25-07-2023	**How to cite this article:** Mohammadi, D., Hatami, A., Eivazian Kary, N., & Farshbaf Pourabad, R. (2024). Studying the combination effect of Celery, *Apium graveolens* extracts with Bt, against potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. *Journal of Iranian Plant Protection Research, 37*(4), 363-379. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81209.1137

Introduction

Potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* is an important pest of potatoes which annually impose economic loss in potato production especially in stored places. Chemical control with spray in farms and fumigation in storages is a conventional method for depressing the population of this pest. In addition, with harmful effects of synthetic pesticides on environment and human health, developing resistant population of insects, compel researchers and plant protection institutions to utilizing new safe control methods. Delaying the resistance by keeping effectiveness of pesticides by using synergists and sublethal concentrations is a resistance management method. *Bacillus thuringiensis* is an effective microbial control agent against some insects. Its effectiveness decreased because of developing resistance in some population of insects. Combination of *Bt* with some botanical biopesticides increases its efficiency that reported in many studies. In this study combination of *B. thuringiensis* with hexane, ethyl acetate and methanol extracts of Celery, *Apium graveolens* were investigated on mortality and some biological parameters of PTM. Celery is a biennial plant in the apiaceae family, which is rich in some compounds such as phenolic and flavonoids. These compounds could affect biology and physiology of insects. Combination of sublethal concentrations of *Bt* with extracts of celery subjected for study of their effects on mortality, synergistic effects and some biological parameters on PTM larvae in this paper.

Materials and Methods

Potato tuber moth colony established by preparing larvae from a health colony in department of plant protection, Azarbaijan Shahid Madani university. Larva reared on potato tubers in plastic containers. Rearing carried out in controlled condition of 26±2ºC, 60% RH and a photoperiod of 16:8 (L: D) hrs.

Foliage of celery after well washing with distilled water, dried in shadow in laboratory condition. Coarsely powdered dry plants used for extraction. Extraction carried out using the maceration method with three solvents, hexane, ethyl acetate and methanol respectively. Sub-lethal concentrations of both agents, including LC_{10}, LC_{30} and LC_{50}, individually and in combination, were assayed by the oral bioassay method. The same age and size of potato

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81209.1137

leaves were impregnated with sub-lethal concentrations of both experimental materials using the dipping method. The first larval instars of PTM were transferred on treated leaves, and mortality was recorded in 48, 96 and 144 hours' intervals. Larval developmental period and adult's emergence as an important biological parameter recorded in all treatments. In addition, the inhibitory activity of extracts on α-amylase and protease enzyme of PTM larva was considered.

Inhibitory activity of celery extracts in two concentrations 1 and 10%, on PTM larvae alpha-amylase activity was assayed by the dinitrosalicylic acid procedure, using 1% soluble starch as a substrate described by Bernfeld, (1955). And protease inhibitory activity assayed using azocasein as substrate, with comparing enzyme activity in controls and present of extracts in reactions.

All experiments were replicated three times. On-way ANOVA analysis of variance in random design was used for statistical analysis. Duncan's multiple range tests used for comparing means. For determining the synergistic, additive or antagonistic effects of combinations, chi-square test conducted between observed and expected results (df=1).

Results and Discussion

The results revealed that ethyl acetate extract of celery in combination with *Bt* synergistically increased the mortality of larvae. Compared to the control, the combination of methanolic extract with *Bt* didn't affect larval mortality. However, the combination of sub-lethal concentrations significantly increased larval life span compared with the control and adult emergence decreased especially in LC_{50} combinations. Increasing the mortality with exposure time progressing, observed in all combinations and the most larval mortality recorded in 144 hours' exposure time. Ethylacetate extract of celery alone and in combination with *Bt* more than other solvents affected biological parameters of PTM. Extracts in the concentration of 10 percent in reactions inhibited α-amylase and protease activity of PTM larvae by 27.97-37.77 and 11.48-25.51 percent, respectively.

Numerous researchers have reported increased efficiency of Bt in combination with other plant extracts for controlling various insects. The observed synergistic effects can be attributed to factors such as disrupting midgut properties, inhibiting digestive enzyme activity, and disrupting the insect's immune system by plant extracts.Inhibitory activity of celery extracts on digestive enzymes activity of PTM larva, well documented in this research which is in alignment with other reports. Effects on larval life span that with prolonging it affects population dynamics of insect pests, reported in same studies. This biological effect has adverse effect on development and physiology of insects and asynchronies developmental stage with environmental variations which finally decrease the population of next generations or overwintering insect's density. Adults and pupa emergence percentage decreased in combination of *Bt* with celery extracts that same results were reported in other researches.

Conclusion

This study aims to determine the effects of different extracts (prepared by different solvents) of celery in combination with *Bt* on potato tuber moth larvae. Effects of different solvents in separating effective compounds on PTM, was not same. In certain instances, the methanol extract of celery showed a minor effect in enhancing the potency of Bt. However, strong synergistic effects were observed with ethyl acetate and hexane extracts at various integrated concentrations. Time also played a crucial role in achieving the desired mortality results, with mortality and synergistic effects increasing over time in all extract combinations with Bt. Particularly, towards the end of the exposure period, a synergistic effect was notably observed in all integrations involving ethyl acetate extract of celery.In addition, with mortality, larval developmental period also affected by combinations. Increasing in life span observed in all treatments with different ratios. Adult emergence decreased strongly in different treatments and this is so important in decreasing the population of PTM. Because of importance of *Bt* as an effective and safe insecticide and increasing the resistance by different pests such as PTM, management of insects in integrated programs using plant extracts will improve the efficiency of *Bt*. Decreasing the sprayed concentrations in combination with other control methods are two important resistance management toll in IPM programs. Celery is a potent plant for this goal and additional studies are needed.

Keywords: Biological effects, Enzyme inhibition, Larval life span, Sublethal concentrations, Synergistic effects

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷ شماره ٤، زمستان ١٤٠٢، ص. ۳۷۹-۳٦۳

مطالعه اثر ترکیب عصاره گیاه کرفس، *Apium graveolens* L. (Apiaceae) با باکتری *Bacillus thuringiensis*، علیه بید سیب‌زمینی، *Phthorimaea operculella* (Lep.: Gelechiidae)

داود محمدی[۱*] - اکرم حاتمی[۲] - ناصر عیوضیان کاری[۱] - رضا فرشباف پورآباد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰

چکیده

بید سیب‌زمینی، *Phthorimaea operculella*، یکی از آفات بسیار مهم سیب‌زمینی است که سالانه خسارات اقتصادی زیادی را در انبار و مزرعه وارد می‌کند. در این بررسی تأثیر تلفیق حشره‌کش میکروبی *Bt* با عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی گیاه کرفس، *Apium graveolens*، بر مرگ و میر و برخی پارامترهای زیستی این آفت مطالعه شده است. عصاره‌گیری با روش خیساندن انجام گرفت. غلظت‌های زیرکشنده عوامل مورد بررسی شامل LC_{50}، LC_{30} و LC_{10} به‌صورت انفرادی و در تلفیق با یکدیگر به‌صورت گوارشی مورد بررسی قرار گرفتند. برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه سیب‌زمینی در هر کدام از تیمارها غوطه‌ور شده و پس از خشک شدن در اختیار لاروهای سن اول بید سیب‌زمینی قرار گرفت. اثرات کشندگی هر غلظت و تلفیق دو عامل در فواصل زمانی ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت ثبت گردید. همچنین اثر مهارکنندگی عصاره‌ها بر آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پروتئاز لاروهای بید سیب‌زمینی نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی کرفس در تلفیق با باکتری *Bt* اثرات سینرژیستی بر مرگ و میر لاروها داشت. تلفیق باکتری *Bt* با عصاره متانولی اثرات کشندگی کمتری نشان داد. همچنین مشخص گردید که تلفیق غلظت‌های زیرکشنده عوامل مورد بررسی تأثیر معنی‌داری بر طول دوره رشدی لاروی داشته و به‌طور معنی‌داری آن را افزایش دادند. همچنین درصد ظهور حشرات کامل به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته و بخصوص در تلفیق غلظت‌های LC_{50} عصاره‌ها و حشره‌کش *Bt*، به شدت کاهش یافت. نتایج مطالعات آنزیمی نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی کرفس در غلظت ۱۰درصد ۳۷/۷۷ درصد فعالیت آنزیم پروتئاز و ۲۵/۵۱ درصد فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لاروهای بید سیب‌زمینی را مهار کردند.

واژه‌های کلیدی: اثرات زیستی، اثر سینرژیستی، دوره رشدی لاروی، غلظت‌های زیرکشنده، مهار آنزیم

۱- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mohamadi@azaruniv.ac.ir)
۲- دانشجوی دوره دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اگه (Ege University)، ۳۵۱۰۰، ازمیر، ترکیه

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81209.1137

مقدمه

بید سیب‌زمینی به‌عنوان یک آفت مزرعه‌ای و انباری مطرح بوده و خسارات زیادی به سیب‌زمینی وارد می‌کند (Jung *et al.*, 2019) خسارت ۵۰ الی ۱۰۰ درصدی در کشورهای مختلفی مانند یمن، پرو، تونس، ترکیه، کنیا و هند گزارش شده است (Rodon, 2010 ; Alvarez *et al.*, 2005). میزبان مرجع آن سیب‌زمینی بوده اما به سایر گیاهان زراعی مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، بادنجان، تنباکو و علف‌های هرز نظیر تاتوره نیز خسارت وارد می‌کند (Capinera, 2020). حشرات کامل در طول فصل زراعی روی اندام‌های هوایی گیاهان و گاهی روی غده‌ها تخم‌ریزی کرده و لاروها به‌صورت مینوز از برگ، دمبرگ و ساقه تغذیه کرده، باعث صدمه دیدن اندام‌های هوایی می‌شوند. هر چند این نوع خسارت تاثیر زیادی در عملکرد نهایی ندارد، اما آلوده شدن غده‌ها، سبب کاهش کیفیت محصول و آلودگی‌های ثانویه شده و از بازارپسندی غده‌ها می‌کاهد (Alvarez *et al.*, 2005; Rondon, 2010).

بید سیب‌زمینی به بسیاری از سموم شیمیایی معمول از قبیل ارگانوفسفات‌ها، کاربامات‌ها و پایتروئیدها مقاوم شده است و کارایی روش کنترل شیمیایی با لحاظ کردن بحث امنیت غذایی و محیط زیست کمرنگ‌تر شده است (El-Dogramaci & Tingey, 2008 ; kady, 2011). استفاده از روش‌های تلفیقی مانند کنترل زراعی، تله‌های فرمونی، کنترل بیولوژیک، گیاهان مقاوم، گیاهان تراریخته حاوی ژن دلتا–اندوتوکسین باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)، حشره‌کش‌های گیاهی، استفاده متناوب از سموم شیمیایی از گروه‌های مختلف، تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات و استفاده تلفیقی و توام با بیش از یک عامل کنترل می‌تواند باعث کاهش زیان اقتصادی آفت شده و اثرات مخرب کمتری روی انسان، موجودات غیرهدف و محیط‌زیست داشته باشد (Alvarez *et al.*, 2005;Capinera, 2001).

حشره‌کش‌های گیاهی، سمیت کمتری برای انسان، موجودات غیرهدف و محیط‌زیست داشته، اغلب صدمه‌ای به گیاه وارد نکرده و تغییری در کیفیت مواد غذایی ایجاد نمی‌کنند (Ngegba *et al.* 2022). تاکنون مقاومت حشرات نسبت به ترکیبات گیاهی (به‌جز ترکیبات مشابه سنتز شده) گزارش نشده است (Isman, 2020). ترکیبات گیاهی به‌دلیل طبیعی و در دسترس بودن می‌توانند در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات برای نیل به کشاورزی پایدار و تولید غذای امن مورد استفاده قرار گیرند (Opender & Walia, 2009; Kuppusamy *et al.*, 2016).

هر چند مطالعات مختلف اثرات قابل قبول کنترلی از عصاره‌های گیاهی را نشان می‌دهد، اما در مطالعات دیگری استفاده همزمان دو عامل کنترل مانند بیمارگرهای حشرات با حشره‌کش‌ها و پاتوژن‌ها با عصاره‌ها نیز با هدف کاهش مصرف سموم و هزینه‌های سم‌پاشی، کاهش دز مصرفی، کاهش اثرات سوء، جلوگیری از بروز مقاومت و احتمال وجود اثرات هم‌افزایی مورد بررسی قرار گرفته است (Reddy Yang *et al.*, 2018 & Chowdary, 2021). به‌عنوان نمونه، استفاده توام *Bt* و آزادیراکتین روی لارو سن سوم شب‌پره‌هندی، *Plodia Interpunctella* Hübner (Lep.: Pyralidae)، به‌دلیل هم‌افزایی باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، کاهش وزن لاروها و کاهش میزان پروتئین، گلیکوژن و لیپید بدن، نسبت به استفاده مجزای ترکیبات شد (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2016). همچنین استفاده از تلفیق *Bt* با پودر زردچوبه، *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae)، در رژیم غذایی شپشه قرمز آرد، *Tribolium castaneum* Herbst 1797 (Col.: Tenebrionidae)، موجب افزایش معنی‌دار مرگ و میر حشرات کامل در مقایسه با تک تک این عوامل گردید (Malik & Riasat, 2014). در مطالعه مشابهی استفاده توام از *Bt* و عصاره مغز دانه چریش و برگ‌های پنج انگشت چینی *Vitex negundo* L. (Verbenaceae) موجب کاهش طول دوره لاروی و شفیرگی، طول عمر و باروری حشرات کامل *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lep.: Pyralidae) شد (Senthil-Nathan *et al.*, 2006). استفاده توام غلظت LC_{50} حشره‌کش آزادیراکتین و *Bt* سبب کاهش وزن لارو، شفیره و افزایش مرگ‌ومیر لاروهای سن سوم کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae)، شد (Abedi *et al.*, 2014). استفاده از *Bt* و آزادیراکتین به‌دلیل هم‌افزایی سبب کاهش تعداد لاروهای زنده مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Noctuidae)، در برگ و ساقه و کاهش آلودگی در گوجه‌فرنگی شده است (Nazarpour *et al.*, 2016).

کرفس، *Apium graveolens* L.، گیاهی دوساله از تیره جعفری (Apiaceae) است که دانه‌ها و اندام‌های هوایی آن حاوی ترکیبات شیمیایی هستند که اثرات زیستی مختلفی بخصوص در حوزه علوم پزشکی به آنها نسبت داده شده است (Khalil *et al.*, 2015). عمده ترکیبات شیمیایی اندام‌های هوایی کرفس ترکیباتی مانند لیمونن[1]، مرسین[2]، ترپینئول[3]، سلینن[4] و پاینن[5] می‌باشد (Kooti *et al.*, 2014; Rożek *et al.*, 2016). که در مطالعات متعددی اثرات زیستی و رفتاری آنها بر حشرات مختلف گزارش شده است (Karr & Coats, 1988; Yildirim *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2020).

استفاده از غلظت‌های زیرکشنده عوامل کنترلی به‌خصوص در بحث مدیریت مقاومت و حمایت از دشمنان طبیعی اهمیت بسیار

1- Limonene
2- Myrcene
3-Terpineol
4- Selinene
5- Pinen

بالایی دارد. غلظت‌های زیرکشنده با اثراتی مانند افزایش و یا کاهش طول دوره رشدی، تغییر در نسبت جنسی، بدشکلی‌های مختلف، کاهش سرعت رشد جمعیت، باروری و زادآوری، تغییر در رفتار تغذیه، میزبان‌یابی و جفت‌یابی و بخصوص اثرات سینرژیستی با سایر عوامل کنترلی در بحث کاهش مصرف سموم، دارای اهمیت بسیار بالایی هستند (Lee, 2000; Stark *et al.*, 2003; de França *et al.*, 2017). اثرات زیرکشندگی عصاره‌های مختلف گیاهان نیز بر زیست-شناسی و رفتار حشرات مختلف مورد توجه محققین مختلف بوده است (Alves *et al.*, 2013; Candido *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016).

موضوع مقاومت حشرات به آفت‌کش‌های متداول و کاهش کارایی آنها، لزوم به‌کارگیری استراتژی‌های جایگزین و یا کاهنده سرعت بروز مقاومت در حشرات را بیش از پیش بیان می‌کند (Zhu *et al.*, 2016). حشره‌کش میکروبی *Bt* نیز از این موضوع مستثنی نبوده و موارد متعددی از مقاومت در آفات مختلف گزارش شده است (El-kady, 2011). طبیعتا استفاده از غلظت‌های بالا و افزایش تعداد دفعات استفاده از سموم شیمیایی روند بروز مقاومت را تسریع خواهد کرد. استفاده از غلظت‌های زیرکشنده هر چند از نظر کشاورزان و تولیدکنندگان محصولات کشاورزی به‌عنوان یک شیوه مدیریت، به دلیل افزایش زمان حصول نتیجه قابل قبول چندان مقبول نیست، ولی مشخص شده است که استفاده از دو یا چند عامل به‌صورت همزمان و یا برای اهداف کنترلی مشخص در زمانهای مختلف، می‌توانند ضمن حصول نتیجه قابل قبول، از بروز اثرات سوء غلظت‌های کشنده نیز جلوگیری کند (Reddy & Chowdary, 2021). موارد متعددی از اثرات سینرژیستی تلفیق غلظت‌های زیرکشنده آفت‌کش‌های مصنوعی و طبیعی و حتی میکروبی با یکدیگر و یا آفت‌کش‌های گیاهی گزارش شده است (Nouri-Rajguru & Sharma, 2012; Ganbalani *et al.*, 2016; Nazarpour *et al.*, 2016). اثرات کشندگی به همراه اثرات زیستی زیرکشنده جزو نتایج موفق گزارش شده هستند. آفت‌کش میکروبی *Bt* جزو آفت‌کش‌های بسیار موفق و امن است که جدایه‌های مختلف آن علیه آفات مختلف مورد استفاده تجاری قرار گرفته است (Sánchez– Plata-Rueda *et al.*, 2020; Sánchez–Yáñez *et al.*, 2022). لزوم حفظ کارایی آن و جلوگیری از تسریع مقاومت در آفات مختلف با توجه به کاربرد وسیع این آفت‌کش احساس می‌شود. کاهش غلظت‌های مورد استفاده از *Bt* و همچنین استفاده تلفیقی با سایر عوامل کنترلی با نحوه اثر متفاوت و مهم‌تر از همه استفاده از پتانسیل اثرات هم افزایی به‌عنوان راه‌کارهای موثر در مدیریت مقاومت به *Bt* ذکر شده است (Khan *et al.*, 2020). گیاه کرفس نیز به‌عنوان منبع متابولیت‌های موثر بر بیولوژی، رفتار و فیزیولوژی حشرات مختلف از پتانسیل خوبی برای استفاده در برنامه‌های مدیریت آفات برخوردار است (Qi *et al.*, 2021).

با توجه به اهمیت بسیار بالای بید سیب‌زمینی به‌عنوان یکی از جدی‌ترین آفات سیب‌زمینی و سایر گیاهان تیره سیب‌زمینی و لزوم اعمال روش‌های کنترل غیرشیمیایی و امن‌تر برای انسان و محیط زیست، و ضرورت استفاده از عوامل کنترلی بخصوص عوامل با منشا طبیعی (عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی) به منظور جلوگیری از بروز مقاومت احتمالی علیه باکتری *Bt*، در این بررسی تأثیر تلفیق غلظت های زیرکشنده *Bt* و عصاره‌های مختلف کرفس بر مرگ و میر لاروهای بید سیب‌زمینی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه سیب‌زمینی

برای بررسی اثرات گوارشی عصاره‌های گیاهی و باکتری *Bt*[1] از برگ‌های تازه سیب‌زمینی رقم آگریا استفاده شد. به این منظور غده های جوانه‌زده سیب‌زمینی داخل گلدان‌های گرد به قطر دهانه ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که حاوی ماسه، خاک زراعی و کود دامی (به نسبت مساوی) بودند، کاشته شدند. دمای پرورشی ۵ ±۲۰درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد انتخاب شد. گلدان‌ها بسته به نیاز آبیاری شده و پس از رشد مناسب گیاهان، از برگ‌ها جهت انجام آزمایشات استفاده شد (Hatami *et al.*, 2022).

پرورش بید سیب‌زمینی

برای تهیه کلنی بید سیب‌زمینی، دسته تخم‌های تهیه شده از انسکتاریوم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، روی غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا منتقل شدند. ظروف پلاستیکی مستطیلی شکل به ابعاد ۱۰×۱۵× ۲۵ سانتی‌متر که کف آنها با ماسه نرم پوشانده شده بود برای پرورش انتخاب شد. پرورش در دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) و رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد صورت گرفت. جهت اطمینان از یکنواخت بودن جمعیت، این حشره حداقل شش نسل در انسکتاریوم روی غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا پرورش یافت (Hatami *et al.* 2022).

تهیه عصاره‌های گیاهی

اندام‌های هوایی گیاه کرفس[2]، *A. graveolens* از بازار سبزی و میوه تهیه شد. پس از شستشو، آبگیری خرد شده، در دمای اتاق ۳±۲۵ درجه سلسیوس در شرایط سایه به مدت ۱۵ روز هوا خشک

۱- حشره‌کش میکروبی بی‌تورین Bt Var Kurstaki®، ساخت شرکت مهر آسیا بیوتکنولوژی؛ MAB Co

۲- رقم Conquistador

شدند. برای عصاره‌گیری از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. گیاه خشک شده اندکی خرد شده و به‌ترتیب قطبیت در حلال‌های ان-هگزان، اتیل‌استات و متانول به نسبت ۱: ۵ (گیاه: حلال) خیسانده شد. برای استحصال حداکثر عصاره‌ها پس از هر ۵ روز مخلوط صاف شده و مجدد از حلال استفاده می‌شد. این عمل در سه مرحله ۵ روزه انجام گرفت. در پایان عصاره استحصالی در سه مرحله باهم ادغام شده و به عنوان عصاره مربوط به حلال مورد نظر کدگذاری و در صورت نیاز در شرایط کاملا تاریک نگهداری می‌شد. عصاره حل شده در حلال‌ها در نهایت صاف شده و از بقایای گیاه برای عصاره‌گیری از حلال قطبی‌تر بعدی استفاده شد. این موضوع موجب جدا شدن عصاره‌های با درجه قطبیت متفاوت می‌شود. هنگام تعویض حلال‌ها، جهت اطمینان از تبخیر کامل حلال قبلی، گیاه به مدت ۳۰ دقیقه در سایه هوادهی می‌شد (Allahverdizade & Mohammadi, 2016).

پس از اتمام دوره خیساندن و صاف کردن، به‌منظور تهیه عصاره‌های گیاهی، از دستگاه تبخیر کننده چرخشی[۱] در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و ۲۵۰rpm برای تمام عصاره‌ها استفاده شد. پس از بازیافت حلال، مواد رسوب یافته به‌عنوان عصاره گیاهی جمع‌آوری، توزین و در شرایط دمایی یخچال، ۴ درجه سلسیوس و شرایط تاریک برای انجام مطالعات بعدی نگه‌داری شدند (Handa *et al*., 2008).

بررسی اثرات سینرژیستی تلفیق عصاره‌های گیاهی با *Bt*

اثرکشندگی حشره‌کش میکروبی *Bt* و عصاره‌های مختلف تهیه شده از کرفس با زیست‌سنجی به روش خیساندن برگ‌های سیب زمینی با غلظت‌های مختلف (گوارشی) در تحقیق قبلی مشخص و از مقادیر غلظت‌های زیرکشنده حاصل از نتایج همان تحقیق در بررسی حاضر استفاده شد (Hatami *et al*. 2022). از سه غلظت زیرکشنده عصاره‌ها و باکتری *Bt* با نقطه پایانی ۲۴ ساعته شامل: LC_{50}, LC_{30}, LC_{10} به‌منظور بررسی اثرات مختلف ممکن سینرژیستی، تجمعی و آنتاگونیستی استفاده شد (جدول ۱). غلظت‌های مختلف باکتری *Bt* و عصاره‌های مختلف گیاهی و همچنین ترکیبات تیماری بین آنها در آب مقطر و ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ تهیه شد. پس از تهیه غلظت‌ها، برگ‌های هم‌اندازه سیب‌زمینی به‌مدت ۱۰ ثانیه در محلول‌های مورد نظر فرو برده و پس از خشک شدن به پتری‌های پلاستیکی ۶ سانتی‌متری منتقل و ۵ لارو سن اول ۲۴ ساعته بید سیب‌زمینی روی برگ‌های هر پتری منتقل شد. برای هر غلظت ۵ پتری در نظر گرفته شد. دم‌برگ‌های سیب‌زمینی با استفاده از پنبه مرطوب نگه‌داشته شده و هر ۷۲ ساعت با برگ‌های جدید تیمار شده با غلظت‌های مربوطه تعویض می‌شد. هر غلظت در ۳ تکرار در زمانهای مختلف ارزیابی شده و کل آزمایشات نیز سه بار تکرار شد. از آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. تیمارها به ژرمیناتور با دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی۵ ±۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) منتقل شد. مرگ و میر لاروها در سه زمان ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت ثبت گردید (Konecka *et al*., 2020).

جدول ۱- غلظت‌های مورد استفاده از عصاره‌های تهیه شده با حلال های مختلف گیاه کرفس و حشره‌کش میکروبی Bt برای بررسی اثرات تلفیق آنها بر لاروهای بید سیب‌زمینی

Table 1- Different concentrations of *Bt* and *Apium graveolens*, used for evaluating their combined effects on *Phthorimaea operculella* larva

عصاره‌ها Extracts	$^*LC_{10}$	LC_{30}	LC_{50}
هگزان Hexane	0.078	0.26	0.613
اتیل استات Ethylacetate	0.014	0.07	0.21
متانول Methanol	3.99	9.07	16.03
Bt	0.78	1.3	1.84

*واحد غلظت‌ها: میلی‌گرم بر لیتر

*Concentration units: mg/l

بررسی برخی اثرات زیستی *Bt*، عصاره‌ها و تلفیق غلظت های مختلف آنها بر لاروهای بید سیب‌زمینی

برای بررسی اثرات زیستی، شامل طول دوره رشدی لاروی و درصد ظهور حشرات کامل، غلظت‌های مورد استفاده برای بررسی اثرات کشندگی (جدول ۱) به‌صورت آزمایش مجزایی اجرا گردید. برای این منظور در ظروف پتری برگهای آلوده شده به هر غلظت و تلفیق غلظت‌های مورد نظر با روش غوطه‌ور کردن تیمار شده پس از خشک شدن و تبخیر آب به پتری‌های مورد نظر منتقل و روی هر برگ تعداد ۱۰ عدد لارو سن اول بید سیب‌زمینی منتقل شد. هر دو روز یکبار برگهای قدیمی با برگهای تیمار شده جدید جایگزین می شدند. با رشد لاروها پس از یک هفته، تراکم لاروها در پتری‌ها با اضافه کردن پتری‌های جدید تعدیل می‌شد. ثبت داده‌ها به‌صورت روزانه تا ظهور حشرات کامل در تمام تیمارها ادامه یافت (Hatami *et al*., 2020).

استخراج آنزیم از لاروهای بید سیب‌زمینی

به‌منظور بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی بر آنزیم های گوارشی آلفا-آمیلاز و پروتئاز تام، نیاز به استخراج آنزیم لاروهای بید سیب‌زمینی بود. به‌این منظور به ازای هر ۵۰ لارو یک روزه بید سیب‌زمینی (بیهوش شده با استفاده از قرار دادن در فریزر)،

۱- Rotary evaporator ساخت شرکت Heidolph

یک میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شده و سپس با استفاده از هموژنایزر (T18 digital ultra turrax) کاملا یکنواخت شد. به‌مدت چهار ساعت در داخل یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روشناور بلافاصله به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌عنوان منبع آنزیم در بررسی‌های مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی بر آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پروتئاز تام مورد استفاده قرار گرفت. برای یکنواختی مطالعات، یک منبع آنزیمی با حجم بالا تهیه شده و تمام مطالعات مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی و اثر مهارکنندگی عصاره‌ها با آن سنجیده شد (Mehrabadi *et al*., 2012).

آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی برای بررسی اثرات مهارکنندگی

به‌منظور بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی، غلظت‌های ۱۰ و ۱ درصد عصاره‌های گیاهی در استون و ۰/۰۵ درصد توئین۸۰ تهیه شد. به‌منظور حذف ذرات معلق احتمالی با استفاده از فیلتر سرنگی دو بار فیلتر شده و به‌عنوان منبع مهارکننده آنزیم‌های گوارشی لاروهای بید سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گرفت (Mehrabadi *et al*., 2012).

سنجش میزان مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و پروتئاز کل بید سیب‌زمینی

به‌منظور بررسی تاثیر احتمالی عصاره‌های گیاهی برآنزیم‌های گوارشی، دو سیستم آنزیمی آلفا-آمیلاز و پروتئاز انتخاب شد. با توجه به فعال شدن پروتوکسین باکتری *Bt* تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئاز گوارشی معده میانی و احتمال اختلال در فعالیت آنزیم‌های گوارشی این دو سیستم آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفت. سنجش فعالیت آلفا-آمیلاز توسط دی نیترو سالسیلیک اسید انجام گرفت. نشاسته یک درصد به‌عنوان زیرنهشت مورد استفاده قرار گرفت. ده میکرولیتر از هر نمونه آنزیمی به‌همراه ۲۰ میکرولیتر محلول نشاسته در داخل لوله‌های آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با ۴۱۰ میکرولیتر بافر فسفات (0.2 M، 7pH) داخل بن‌ماری انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر دی نیتروسالسیلیک اسید متوقف شده و لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۵ دقیقه داخل آب جوش حرارت داده شده و بلافاصله به‌مدت پنج دقیقه داخل آب یخ قرار داده شدند. سپس داخل میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس به‌مدت پنج دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول روشناور در ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. شاهد، فاقد نشاسته بود. تمام سنجش‌ها در سه تکرار انجام گرفت (Bernfeld *et al*., 1955).

برای سنجش مهارکنندگی غلظت‌های مورد نظر عصاره‌ها (۱ و ۱۰ درصد) با آنزیم حشره به‌مدت ۱۰ دقیقه پیش انکوبه شده و بقیه مراحل مثل روش اشاره شده انجام گرفت. درصد مهارکنندگی از فرمول زیر محاسبه شد (فرمول شماره ۱):

(۱)

$$\text{٪مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب در شاهد} - \text{جذب در تیمار}}{\text{جذب در شاهد}} \times ۱۰۰$$

برای حصول اطمینان، اثر مهارکنندگی هر غلظت مهارکننده پنج بار تکرار شد.

از آزوکازئین (Azocasein) به‌عنوان زیرنهشت[1] برای اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز تام استفاده شد. در یک لوله آزمایش (به‌حجم ۱۰میلی‌لیتر) مقدار ۱۰۰µl از محلول آنزیمی حشره، همراه ۲۰۰µl بافر گلایسین (0.2 M glycine-NaOH, pH 10) حاوی ۵mM کلریدکلسیم، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس مقدار ۲۰۰µl آزوکازئین ٪۱ (w/v) اضافه شده به‌مدت ۶۰ دقیقه دیگر در شرایط مذکور نگهداری شد تا واکنش صورت پذیرد. با اضافه کردن ۳۰۰µl محلول ٪۱۰ Trichloroacetic acid(TCA) واکنش متوقف شد. لوله آزمایش به‌مدت ۲۰ دقیقه به ظرف حاوی آب یخ منتقل شده سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده سپس به‌محلول سطحی حجم مساوی NaOH(1M) اضافه شد در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول شاهد با اضافه کردن حجم مساوی بافر بجای زیرنهشت تهیه شد. برای بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم پروتئاز تام، ۱۰ دقیقه قبل از اضافه کردن سوبسترا نمونه آنزیمی با عصاره پیش انکوبه شده و بقیه مراحل مثل بالا انجام گرفت. درصد مهارکنندگی با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد. برای حصول اطمینان، اثر مهارکنندگی هر غلظت مهار کننده پنج بار تکرار شد (Aghaali *et al*., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی اثرات مختلف تلفیق باکتری *Bt* با عصاره‌های مختلف گیاهی از روش مورد استفاده توسط کوپن هوفر و کایا (Koppenhöfer & Kaya, 1997) و با محاسبه مرگ و میر مشاهده شده و مرگ و میر قابل انتظار و بررسی اختلاف آنها با استفاده از محاسبه کیدو (χ^2) با درجه آزادی ۱ به‌صورت زیر انجام گرفت (فرمول شماره ۲):

$$M_E = M_{Bt} + M_{ex}(1 - M_{Bt}), \ \chi^2 = (M_{Btex})^2 / M_E \quad (۲)$$

$$D = M_{Bt\,\&\,ex} - M_E$$

1- Substrate

که در آن M_E مرگ‌ومیر مورد انتظار، M_{Bt} میانگین درصد مرگ‌ومیر مشاهده شده در Bt، M_{ex} میانگین درصد مرگ‌و میر مشاهده شده در عصاره، $M_{Bt\&ex}$ میانگین درصد مرگ‌ومیر مشاهده شده در اختلاط عصاره و *Bt*، χ^2 فاکتور کیدو و D شاخص سینرژیستی می‌باشد. χ^2 به‌دست آمده با جدول کیدو و درجه آزادی یک (df= 1) مورد مقایسه قرار گرفت. اگر مقدار عددی χ^2 کوچک‌تر از ۳/۸۴ (جدول کیدو، درجه آزادی ۱) باشد اثر به‌صورت افزایشی[1] و اگر بزرگتر از ۳/۸۴ باشد اثر هم‌افزایی[2] یا آنتاگونیستی[3] است. مقدار عددی D اگر مثبت باشد اثر سینرژیستی و اگر منفی باشد آنتاگونیستی است (Koppenhöfer & Kaya, 1997).

مقایسات میانگین با استفاده از آزمون توکی و نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. برای ترسیم اشکال از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

اثرکشندگی تلفیق غلظت‌های زیرکشنده عصاره هگزانی *A. graveolens* با *Bt* بر لاروهای بید سیب‌زمینی در زمان‌های مختلف

نتایج تأثیر تلفیق سه غلظت زیرکشنده باکتری *Bt* و عصاره هگزانی کرفس علیه لاروهای سن اول بید سیب‌زمینی در زمان‌های مختلف، در جدول ۲ خلاصه شده است. مرگ و میر با افزایش غلظت افزایش یافته است و روند افزایش مرگ و میر با گذشت زمان نیز مثبت می‌باشد. در ۴۸ ساعت اول، تیمار تلفیق LC_{30} حشره‌کش *Bt* با دو غلظت LC_{30} و LC_{50} عصاره هگزانی و تلفیق LC_{50} حشره‌کش *Bt* با دو غلظت LC_{30} و LC_{50} عصاره هگزانی، اثرات سینرژیستی خوبی نشان دادند. اثرات سینرژیستی بخصوص با افزایش زمان و ۱۴۴ ساعت بعد در اغلب ترکیبات تیماری مشاهده گردید. به‌طوری‌که بجز تلفیق دو غلظت LC_{10} و LC_{50} عصاره هگزانی و *Bt* در بقیه موارد اثرات سینرژیستی خوبی مشاهده شد (جدول ۲).

اثر کشندگی تلفیق غلظت‌های زیرکشنده عصاره اتیل‌استاتی *A. graveolens* با *Bt* بر لاروهای بید سیب زمینی در زمان‌های مختلف

مطابق جدول ۳ در ترکیب غلظت‌های زیرکشنده عصاره اتیل‌استاتی *A. graveolens* و *Bt* هم همان‌طور که انتظار می‌رفت، درصد مرگ‌ومیر با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. این موضوع بخصوص در غلظت‌های پایین بیشتر مشهود است (جدول ۳)

با توجه به جدول ۳، تیمار $M_{B+EA}(LC_{50}\&LC_{50})$ با ۹۳/۳۳ درصد مرگ‌ومیر و ۲۵/۴۴ درصد هم‌افزایی، بیشترین اثر سینرژیستی در زمان ۴۸ ساعت و در سطح احتمال ۰/۰۱ را نشان داد. همچنین تیمار $M_{B+EA}(LC_{50}\&LC_{30})$ در زمان ۹۶ ساعت با ۹۶/۶۶ درصد تلفات و ۲۶/۲۲ درصد هم‌افزایی در سطح احتمال ۰/۰۱ بیشترین اثر سینرژیستی نشان داد. در زمان ۱۴۴ ساعت، تیمار $M_{B+EA}(LC_{30}\&LC_{30})$ با ۹۸ درصد تلفات و ۲۸/۴۵ درصد هم‌افزایی در سطح احتمال ۰/۰۱، بیشترین اثر سینرژیستی را در این زمان داشته است. همچنین در بین تمام تیمارها و در سه زمان مورد مطالعه، تیمار $M_{B+EA}(LC_{30}\&LC_{30})$ بیشترین اثر سینرژیستی را داشته است. در این آزمایش در زمان ۱۴۴ ساعت، ترکیب تمام غلظت‌های زیرکشنده، اثر سینرژیستی داشته و بیانگر تأثیر مثبت زمان در اثرات سینرژیستی می‌باشد. در مقایسه با عصاره هگزانی حتی در ۹۶ ساعت نیز اثرات سینرژیستی بیشتری در تلفیق غلظت‌های مختلف مشاهده گردید که بیانگر تأثیر خوب تلفیق عصاره اتیل استاتی با حشره‌کش میکروبی *Bt* می‌باشد.

اثر کشندگی تلفیق غلظت‌های زیرکشنده عصاره متانولی *A. graveolens* با *Bt* بر لاروهای بید سیب‌زمینی در زمان های مختلف

با توجه به جدول ۴، در ترکیب غلظت‌های زیرکشنده عصاره متانولی *A. graveolens* و *Bt*، با افزایش مدت زمان تغذیه لاروها از برگ‌های آغشته به غلظت‌های مورد مطالعه، درصد تلفات لاروها نیز افزایش یافته است و در زمان ۱۴۴ ساعت، بیشترین درصد مرگ‌ومیر در هر یک از تیمارها مشاهده شده است.

در زمان ۴۸ ساعت تیمار $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{50})$ با ۶۶/۶۶ درصد کشندگی و ۲۴/۹۹ درصد هم‌افزایی بیشترین اثر سینرژیستی را داشته است.

در زمان ۹۶ ساعت فقط تیمار $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{50})$ اثر سینرژیستی داشته است. اما در زمان ۱۴۴ساعت علاوه بر تیمار $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{50})$ در تیمارهای $M_{B+Me}(LC_{30}\&LC_{30})$، $M_{B+Me}(LC_{30}\&LC_{50})$، $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{10})$ و $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{30})$ نیز اثر سینرژیستی مشاهده شد و تیمار $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{50})$ با ۹۳/۶۱ درصد تلفات و ۲۳/۳۲ درصد هم‌افزایی، بیشترین اثر سینرژیستی در بین تیمارها را داشته است. در بین تمام تیمارها و در سه زمان، تیمار $M_{B+Me}(LC_{50}\&LC_{50})$ در تمام زمان‌های مورد بررسی اثرات سینرژیستی نشان داد. همانگونه که از مقایسه جدول‌ها مشاهده می‌شود عصاره متانولی در مقایسه با دو عصاره هگزانی و اتیل‌استاتی اثرات سینرژیستی کمتری حتی با گذشت زمان نشان داده است.

1- Additive
2- Synergistic
3- Antagonistic

جدول ۲- مقایسه تاثیر غلظت‌های زیرکشنده عصاره هگزانی کرفس با *Bt* و تلفیق آنها علیه لاروهای سن اول بید سیب‌زمینی در زمان‌های مختلف

Table 2- Comparing effects of sub-lethal concentration of *Bt* with *A. graveolens* hexane extract and their integrations on PTM first larval instar, during different time intervals

تیمارها Treatments		۴۸ ساعت 48 Hours			۹۶ ساعت 96 Hours			۱۴۴ ساعت 144 Hours		
Bt	**HA***	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^{2**}**	**D*****	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^2**	**D**	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^2**	**D**
LC_{10}	-	13.10±0.51	-	-	19.65±0.77	-	-	32.75±1.28	-	-
LC_{30}	-	32.75±1.28	-	-	45.85±1.80	-	-	55.68±2.18	-	-
LC_{50}	-	45.85±1.80	-	-	55.68±2.18	-	-	62.23±2.44	-	-
-	LC_{10}	9.83±0.38	-	-	19.65±0.77	-	-	26.20±1.03	-	-
-	LC_{30}	26.20±1.03	-	-	32.75±1.28	-	-	39.31±1.54	-	-
-	LC_{50}	42.58±1.67	-	-	49.13±1.92	-	-	55.68±2.18	-	-
LC_{10}	LC_{10}	29.48±1.15	2.91	8	39.31±1.54	0.44	4	62.23±2.44	2.92	12.21
LC_{10}	LC_{30}	45.85±1.80	2.86	10.22	58.96±2.31	3.81	13.32	78.61±3.08	6.65	**20**
LC_{10}	LC_{50}	58.96±2.31	1.63	9.11	78.61±3.08	6.65	**20**	94.84±3.62	9.18	**25.54**
LC_{30}	LC_{10}	45.85±1.80	1.10	6.66	68.79±2.69	2.80	12.67	88.44±3.46	6.95	**21.78**
LC_{30}	LC_{30}	65.51±2.56	4.73	**15.55**	85.16±3.33	7.65	**22.21**	96.97±3.03	9.13	**26**
LC_{30}	LC_{50}	78.61±3.08	5.08	**17.78**	96.97±3.03	9.69	**26.67**	96.97±3.03	4.34	**18.78**
LC_{50}	LC_{10}	62.23±2.44	2.47	11.33	78.61±3.08	2.29	14.67	94.84±3.62	7.58	**23.56**
LC_{50}	LC_{30}	75.33±2.95	4.08	**15.77**	94.84±3.62	9.18	**25.56**	96.97±3.02	6.20	**22**
LC_{50}	LC_{50}	94.84±3.62	10.36	**26.88**	96.97±3.03	5.95	**21.67**	96.97±3.01	3	15.89

*عصاره هگزانی کرفس، **کیدو با درجه آزادی یک، ***شاخص تعیین کننده نوع اثر در تلفیق. اگر مقدار کیدو کوچکتر از ۳/۸۴ باشد نشان دهنده یک اثر افزایشی است، اگر مقدار کیدو از ۳/۸۴ بزرگتر باشد و مقدار عددی D مثبت باشد نشان دهنده اثر هم‌افزایی و اگر منفی باشد نشان دهنده اثر آنتاگونیستی است. مقادیر D نوشته شده به‌صورت ضخیم نشان دهنده اثر هم‌افزایی است.

*Hexane extract of *A. graveolens,* ** Chi square in df=1, *** Index for determining the type of combination effect. If χ^2<3.84 comprise an additive effect, if χ^2>3.84 the positive and negative amounts of D, indicates synergistic and antagonistic effect respectively. Amounts of D marked as bold shows a synergistic effect.

جدول ۳- مقایسه تاثیر غلظت‌های زیرکشنده عصاره اتیل‌استاتی کرفس با *Bt* و تلفیق آنها علیه لاروهای بید سیب‌زمینی در زمان‌های مختلف

Table 3- Comparing effects of sub-lethal concentration of *Bt* with *A. graveolens* ethyl acetate extract and their integrations on PTM first larval instar, during different time intervals

تیمارها Treatments		۴۸ ساعت 48 Hours			۹۶ ساعت 96 Hours			۱۴۴ ساعت 144 Hours		
Bt	**EA***	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^{2**}**	**D*****	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^2**	**D**	**درصد مرگ ومیر Mortality%**	**χ^2**	**D**
LC_{10}	-	16.90±0.77	-	-	27.04±1.22	-	-	33.81±1.53	-	-
LC_{30}	-	27.04±1.22	-	-	37.18±1.68	-	-	47.33±2.14	-	-
LC_{50}	-	43.95±1.99	-	-	54.09±2.45	-	-	64.23±2.91	-	-
-	LC_{10}	10.14±0.46	-	-	20.29±0.92	-	-	27.04±1.22	-	-
-	LC_{30}	30.43±1.38	-	-	37.18±1.68	-	-	47.33±2.14	-	-
-	LC_{50}	43.95±1.99	-	-	57.47±2.60	-	-	67.61±3.06	-	-
LC_{10}	LC_{10}	33.81±1.53	2.78	8.33	50.71±2.30	1.81	8.67	67.61±3.06	4.73	**15.54**
LC_{10}	LC_{30}	40.57±1.84	0.06	-1.66	71.00±3.21	5.05	**16.45**	87.90±3.98	7.66	**22.21**
LC_{10}	LC_{50}	67.61±3.06	3.65	13.88	87.90±3.98	4.98	**18.44**	98.43±4.59	6.35	**22.23**
LC_{30}	LC_{10}	47.33±2.14	4.71	**12.65**	60.86±2.76	2.30	10.67	81.14±3.67	6	**19.11**
LC_{30}	LC_{30}	64.23±2.91	4.42	**14.65**	81.14±3.67	6.76	**20.11**	95.24±4.76	11.31	**28.45**
LC_{30}	LC_{50}	77.76±3.52	5.68	**18.22**	94.12±4.31	8.01	**24.11**	95.24±4.76	3.85	**17.78**
LC_{50}	LC_{10}	60.86±2.76	2.47	11	81.14±3.67	4.79	**17.32**	98.04±4.44	7.58	**23.5**
LC_{50}	LC_{30}	81.14±3.67	6.41	**19.65**	94.12±4.31	9.76	**26.22**	95.24±4.76	4.75	**19.55**
LC_{50}	LC_{50}	93.01±4.13	9.53	**25.43**	90.67±4.70	5.12	**20.21**	97.78±2.22	1.7	1.22

*عصاره اتیل استاتی کرفس، **کیدو با درجه آزادی یک، ***شاخص تعیین کننده نوع اثر در تلفیق، اگر مقدار کیدو کوچکتر از ۳/۸۴ باشد نشان دهنده یک اثر افزایشی است، اگر مقدار کیدو از ۳/۸۴ بزرگتر باشد و مقدار عددی D مثبت باشد نشان دهنده اثر هم‌افزایی و اگر منفی باشد نشان دهنده اثر آنتاگونیستی است. مقادیر D نوشته شده به‌صورت ضخیم نشان دهنده اثر هم‌افزایی است.

Ethyl acetate extract of *A. graveolens, Chi square in df=1,*** Index for determining the type of combination effect. If χ^2<3.84 comprise an additive effect, if χ^2>3.84 the positive and negative amounts of D, indicates synergistic antagonistic effect respectively. Amounts of D marked as bold shows a synergistic effect.

جدول ٤- مقایسه تاثیر غلظت‌های زیرکشنده عصاره متانولی کرفس با *Bt* و تلفیق آنها علیه لاروهای بید سیب‌زمینی در زمانهای مختلف

Table 4- Comparing effects of sub-lethal concentration of *Bt* with *A. graveolens* methanol extract and their integrations on PTM first larval instar, during different time intervals

تیمارها Treatments		٤٨ ساعت 48 Hours			٩٦ ساعت 96 Hours			١٤٤ ساعت 144 Hours		
Bt	MA*	درصد مرگ ومیر Mortality%	χ^{2**}	D***	درصد مرگ و میر Mortality%	χ^2	D	درصد مرگ و میر Mortality%	χ^2	D
LC_{10}	-	1.88±0.94	-	-	6.80±0.27	-	-	17.01±068	-	-
LC_{30}	-	17.01±0.68	-	-	23.82±0.96	-	-	34.02±1.37	-	-
LC_{50}	-	30.63±1.23	-	-	37.42±1.50	-	-	51.04±2.05	-	-
-	LC_{10}	3.40±0.14	-	-	10.21±0.41	-	-	20.42±0.82	-	-
-	LC_{30}	6.80±0.27	-	-	17.01±0.68	-	-	27.22±1.09	-	-
-	LC_{50}	17.01±0.68	-	-	27.22±1.09	-	-	40.83±1.64	-	-
LC_{10}	LC_{10}	10.21±0.41	13.36	**6.67**	23.82±0.96	3.36	7.33	44.23±1.78	3	10
LC_{10}	LC_{30}	13.61±0.55	6.68	**6.67**	27.22±1.09	0.89	4.44	47.63±1.91	1.55	7.78
LC_{10}	LC_{50}	27.22±1.09	6	**10**	40.83±1.64	2.26	8.45	64.65±2.60	3.55	13.32
LC_{30}	LC_{10}	23.82±0.96	0.78	3.89	37.42±1.50	1.03	5.65	61.25±2.46	3.81	13.34
LC_{30}	LC_{30}	30.63±1.23	2.73	7.78	44.23±1.78	1.44	7.22	68.05±2.74	4.73	**15.54**
LC_{30}	LC_{50}	37.42±1.50	1.22	6.11	57.84±2.33	3.79	12.85	81.67±3.28	6.65	**20**
LC_{50}	LC_{10}	40.83±1.64	1.81	7.66	54.44±2.19	2.48	10.32	78.26±3.15	4.62	**16.66**
LC_{50}	LC_{30}	44.23±1.78	2.16	8.65	61.25±2.46	3.46	12.78	81.67±3.27	4.38	**16.67**
LC_{50}	LC_{50}	68.05±2.74	14.95	**24.96**	78.26±3.15	9.97	**23.11**	93.61±3.61	7.78	**23.32**

*عصاره متانولی کرفس، ** کیدو با درجه آزادی یک، ***شاخص تعیین کننده نوع اثر در تلفیق. اگر مقدار کیدو کوچکتر از ۳/۸۴ باشد نشان دهنده یک اثر افزایشی است، اگر مقدار کیدو از ۳/۸۴ بزرگتر باشد و مقدار عددی D مثبت باشد نشان دهنده اثر هم‌افزایی و اگر منفی باشد نشان دهنده اثر آنتاگونیستی است. مقادیر D نوشته شده به‌صورت ضخیم نشان دهنده اثر هم‌افزایی است.

*Methanol extract of *A. graveolens*, ** Chi square in df=1, *** Index for determining the type of combination effect. If χ^2<3.84 comprise an additive effect, if χ^2>3.84 the positive and negative amounts of D, indicates synergistic antagonistic effect respectively. Amounts of D marked as bold shows a synergistic effect.

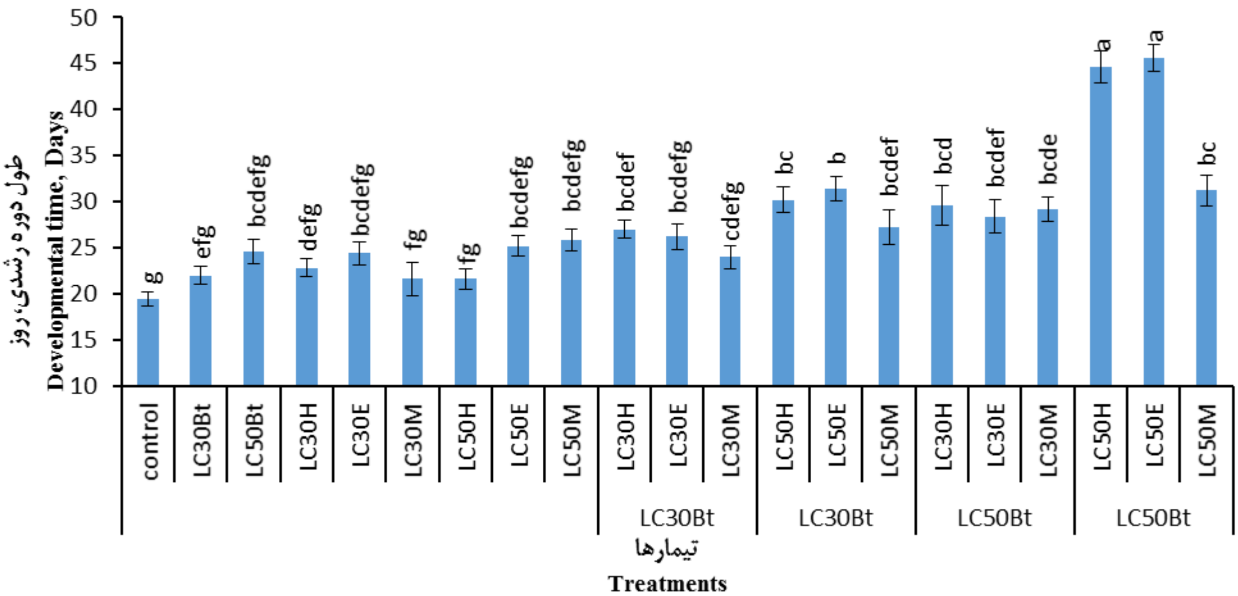
تأثیر غلظت‌های زیرکشنده عصاره‌های گیاهی و تلفیق آنها با *Bt* بربرخی شاخص‌های زیستی بید سیب‌زمینی

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تغذیه لاروهای بید سیب‌زمینی از برگ‌های تیمار شده با غلظت‌های زیرکشنده *Bt* و عصاره‌های مختلف گیاه کرفس تأثیر معنی‌داری از نظر آماری بر طول دوره رشدی آنها دارد ($F_{24, 84}$ =22.49 p<0.0001). همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تقریبا در تمام موارد، طول دوره رشدی تیمارها بیشتر از شاهد است. بیشترین میزان افزایش، در تلفیق غلظت LC_{50} حشره‌کش *Bt* با غلظت مشابه عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی کرفس مشاهده شد. تلفیق این غلظت‌ها طول دوره رشدی لاروی را تا ۲۵ روز در مقایسه با شاهد افزایش داده است. در تلفیق غلظت‌های LC_{30} حشره‌کش *Bt* با غلظت‌های LC_{50} عصاره‌ها نیز به‌طور معنی داری طول دوره رشدی افزایش یافته است و بین ۴/۵ الی ۱۲ روز در مقایسه با شاهد افزایش ثبت گردید که نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تلفیق آنها در مقایسه با تک تک این عوامل است (شکل ۱). همچنین تلفیق غلظت LC_{50} حشره‌کش *Bt* با غلظت LC_{30} عصاره‌های گیاهی نیز ۹ الی ۱۰ روز در مقایسه با شاهد طول دوره رشدی لاروی را افزایش داده است این درحالی است که خود این عوامل به تنهایی تأثیر کمتری بر طول دوره رشدی داشتند (افزایش ۲/۵ الی ۵ روزه).

عصاره‌های گیاهی، *Bt* و تلفیق غلظت‌های مختلف زیرکشندگی آنها تأثیر بسیار معنی‌داری بر درصد ظهور حشرات کامل در مقایسه با شاهد نیز داشتند ($F_{24, 84}$=83.26, p<0.0001) (شکل ۲). تلفیق غلظت‌های مختلف دو عامل به مراتب بیشتر از تک تک عوامل درصد ظهور حشرات کامل را کاهش داد. تلفیق غلظت LC_{50} حشره‌کش *Bt*، با همان غلظت عصاره هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی به‌ترتیب ۳، ۳ و ۲۱ درصد، ظهور حشرات کامل نشان دادند که کمترین میزان در بین ترکیبات تیماری مختلف بود. تمام ترکیبات تیماری مورد بررسی تأثیر معنی‌داری بر کاهش درصد ظهور حشرات کامل داشتند و بخصوص عصاره متانولی کرفس به‌طور مشخصی در کاهش ظهور حشرات کامل مؤثر بود.

نتایج درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز و پروتئاز تام لاروهای بید سیب‌زمینی، توسط عصاره‌های مختلف کرفس

نتایج مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی در جدول ۵ خلاصه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود به‌ترتیب عصاره اتیل‌استاتی، هگزانی و متانولی کرفس موجب مهار ۲۵/۵۱ ، ۱۳/۸۸ و ۱۱/۴۸ درصدی آنزیم آلفا-آمیلاز بید سیب‌زمینی شده است و در غلظت‌های یک درصد نیز عصاره اتیل‌استاتی بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد. همچنین عصاره اتیل‌استاتی در غلظت ۱۰ درصد بیشترین اثر مهارکنندگی را بر آنزیم پروتئاز دارد و نزدیک ۳۸ درصد فعالیت آن‌را مهار کرده است. عصاره هگزانی و متانولی بدون اختلاف معنی‌داری در مرتبه بعدی حدود ۲۸ درصد فعالیت آنزیم پروتئاز را مهار کرده است. ولی در غلظت یک درصد بیشترین اثر مهارکنندگی در عصاره هگزانی مشاهده شد.

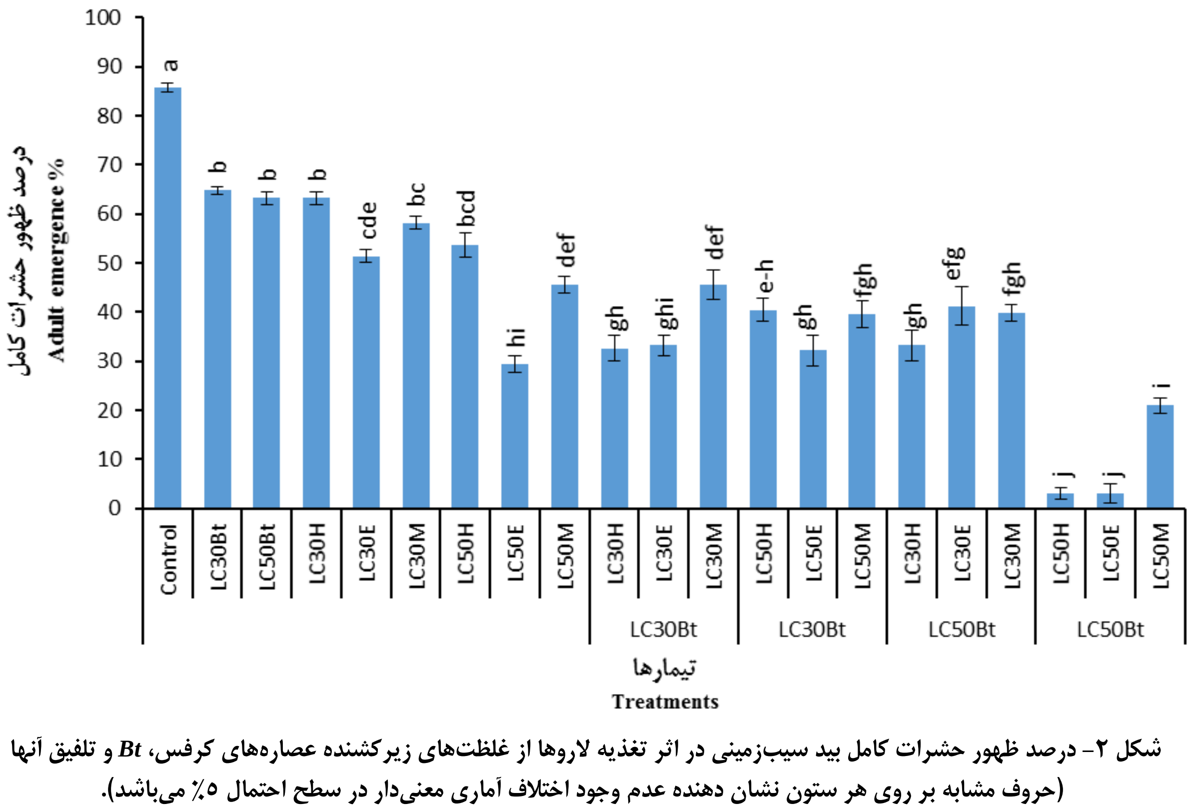


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های زیر کشنده عصاره‌های مختلف کرفس، *Bt* و تلفیق آنها بر طول دوره رشدی بید سیب‌زمینی

(حروف مشابه بر روی هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد).

Figure 1- Effects of sub-lethal concentrations of *Bt, A. graveolens* and their combinations on Larval developmental time (days) of PTM

(The same letters in each bars considers as non-significant statistically (p=0.05)).



شکل ۲- درصد ظهور حشرات کامل بید سیب‌زمینی در اثر تغذیه لاروها از غلظت‌های زیرکشنده عصاره‌های کرفس، *Bt* و تلفیق آنها

(حروف مشابه بر روی هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد).

Figure 2- Percent adult emergence of PTM which feed with sub-lethal concentrations of *Bt, A. graveolens* extracts and their combinations

(The same letters on each bar considers as non-significant statistically (*p*=0.05)).

جدول ۵- درصد مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پروتئاز کل لاروهای بید سیب‌زمینی با غلظت‌های مختلف عصاره‌های کرفس

Table 5- Alpha-amylase and protease inhibitory activity of different concentrations of *A. graveolens* extracts on PTM larvae

آنزیم Enzyme	غلظت عصاره Extract concentration	مهارکنندگی عصاره‌های گیاه کرفس *A. graveolens* extracts inhibitory activity هگزان Hexane	اتیل استات Ethylacetate	متانول Methanol
آلفا-آمیلاز α-amylase	10%	13.88±2.87[b*]	25.51±3.29[a]	11.48±1.63[b]
	1%	6.26±1.08[b]	11.31±2.61[b]	6.34±1.29[b]
پروتئاز Protease	10%	28.77±6.64[ab]	37.77±5.46[a]	27.97±3.21[abc]
	1%	18.99±4.75[abc]	6.20±5.66[c]	10.84±3.74[bc]

*حروف مشابه در هر سیستم آنزیمی نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

*The same letters in each enzyme system considers as non-significant statistically (p=0.05)

بحث

افزایش تأثیر حشره‌کش میکروبی *Bt* در تلفیق با عصاره‌های گیاهی در مطالعات متعددی گزارش شده است که مؤید پتانسیل بالای استفاده از اثرات تلفیقی این عوامل برای افزایش کشندگی *Bt* می‌باشد (Nouri-Ganbalani *et al*., Rajguru *et al*., 2011; 2016). هر چند مکانیسم عمل دقیق اثر تلفیق *Bt* با عصاره گیاهان، بر مرگ و میر حشرات مشخص نیست، ولی با توجه به مطالعات متعدد صورت گرفته، اختلال در سامانه گوارشی، مهار آنزیم‌های گوارشی، ضعف لاروها در اثر سوء تغذیه، تأثیر بر سیستم ایمنی و حتی تأثیر بر سیستم عصبی حشرات توسط ترکیبات گیاهی به‌عنوان مکانیسم عمل، در نتایج تحقیقات زیادی گزارش شده است (Singh; El-Wakeil, 2013; Ali *et al*., 2021; Rattan, 2010; Madasamy, *et al*., 2023). براساس نتایج بدست‌آمده در تحقیق حاضر، عصاره اتیل‌استاتی کرفس، آنزیم پروتئاز لاروهای بید سیب زمینی را تا ۳۸ درصد مهار کرد و اثرات کشندگی بالایی نیز در مقایسه با سایر عصاره‌ها ثبت گردید. هر چند به‌طور یقین نمی‌توان دلیل افزایش فعالیت *Bt* در تلفیق با عصاره‌های گیاهی به اثر مهارکنندگی آنها بر آنزیم‌های پروتئاز نسبت داد چون در موارد متعددی مشخص شده است که فعالیت پروتئولایتیک معده میانی برای فعال نمودن پروتوکسین باکتری لازم و ضروری است (Talaei-Hassanloui *et al*., 2014; Visweshwar *et al*., 2018) ولی یکی از دلایل احتمالی افزایش تأثیر *Bt* در تلفیق با عصاره قلمداد می‌شود. تأثیر مهارکننده‌های آنزیمی پروتئاز در تلفیق با حشره‌کش میکروبی *Bt* علیه کرم غوزه پنبه، *H. armigera* بررسی و مشخص گردید اکثر مهارکننده‌ها اثر سینرژیستی بر مرگ و میر لاروهای این آفت دارند (Gujar *et al*., 2004). همچنین در بررسی مشابهی (Mesén-Porras *et al*., 2020) اثر سینرژیستی کشندگی مهارکننده استخراج شده از سویا با *Bt* علیه سوسک قهوه، *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col.: Curculionidae) اثبات شده است. با توجه به اهمیت بالای سیستم آنزیمی پروتئاز در رشد و نمو لاروهای بید سیب‌زمینی و با توجه به نتایج تحقیقات مشابه، مهار این آنزیم توسط عصاره گیاهی از دلایل عمده اثرات سینرژیستی مشاهده شده در تحقیق حاضر است.

کاهش فعالیت آنزیم آلفا-امیلاز نیز به‌عنوان عاملی مؤثر در بر هم خوردن تعادل هضم و جذب در معده میانی لاروهای بید سیب‌زمینی می‌تواند نقش مؤثری در نتایج کشندگی مشاهده شده ایفا کند. آنزیم آلفا-آمیلاز با هضم نشاسته، قند مورد نیاز برای فعالیت و رشد و نمو لارو را فراهم می‌کند (Da Lage, 2018;Yazdani *et al*., 2010). با توجه به اینکه قند اولین منبع سوخت و ساز سلولی در حشرات است، عدم دریافت مقادیر مورد نیاز می‌تواند اثرات مخرب زیستی و فیزیولوژیکی بر لاروها داشته باشد (Hussain Shah, 2017; Schoor *et al*., 2020). با توجه به اینکه اثر مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز عصاره‌های مختلف کرفس اثبات شده است (Zhang *et al*., 2022) و در بررسی حاضر نیز نتیجه مشابهی مشاهده گردید، شاید بتوان دلیل افزایش تأثیر *Bt* در تلفیق با عصاره های مختلف را مهار آنزیم آلفا-آمیلاز لاروهای بید سیب‌زمینی بیان نمود. بهبود کارایی *Bt* در تلفیق با عصاره اتانولی برگ سرو نقره‌ای، *Cupressus arizonica* (Greene)، علیه کرم برگخوار چغندر قند، *Spodoptera exigua* Hübner (Lep.: Nuctoidae)، در مطالعه محمدی و همکاران (Mohammadi *et al*., 2020) گزارش شده است. تلفیق غلظت‌های زیرکشنده دو عامل، کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI[1]) را تحت تأثیر قرار داده و نتیجه آن کاهش ظهور شفیره و حشرات کامل کرم برگخوار چغندر قند در مقایسه با شاهد بود که با نتایج تحقیق حاضر از نظر نتیجه مشاهده شده همخوانی دارد.

در بررسی حاضر، گذشته از دلیل اثرات سینرژیستی مشاهده شده، نتیجه اثرات زیرکشندگی نیز بسیار با ارزش بود. طول دوره رشدی

1- Efficiency of ingested food

لاروی بخصوص در غلظت‌های LC_{50} عصاره‌ها و *Bt* افزایش چشم‌گیری داشت و در نهایت درصد بسیار پایینی از لاروها موفق به طی دوره شفیرگی شده و به مرحله ظهور حشره کامل رسیدند. این موضوع بخصوص از نظر پویایی جمعیت و کاهش معنی‌دار در ظهور حشرات کاملی که نسل بعدی را بوجود خواهند آورد اهمیت دارد. اختلال در سامانه گوارشی حشرات تأثیر منفی بر نشو و نمای حشرات دارد. هضم و جذب مواد غذایی دچار اختلال شده و به‌دلیل عدم دریافت مواد غذایی کافی حشرات دچار سوء هاضمه و مشکلات نشو و نمایی می‌شوند. مطالعات متعددی مؤید این موضوع است (Senthil- Nathan *et al*., 2006; Rajguru & Sharma, 2012; Abedi *et al*., 2014; Khorrami & Soleymanzade, 2021). در یک مطالعه تأثیر تلفیق عصاره‌های گیاهی با *Bt* بر مرگ و میر و میزان نفوذ لاروهای بید سیب‌زمینی بررسی شد. نتایج نشان داد که تلفیق این عوامل هر چند اثرات سینرژیستی در مقایسه با کاربرد عوامل به‌صورت انفرادی نداشت ولی اثرات جمعیتی خوبی داشته و پیشنهاد شده است که استفاده از تلفیق این عوامل ضمن نتیجه مطلوب موجب کاهش احتمال بروز افراد مقاوم در جمعیت بید سیب‌زمینی شده و مصرف سموم شیمیایی را کاهش خواهد داد (Fouad Sharaby *et al*., 2019). در یک بررسی دیگر اثرات تلفیق غلظت‌های زیرکشنده باکتری *Bt* و NPV بر *S. littoralis* مورد بررسی قرار گرفت (Magholi Fard *et al*., 2020). نتایج نشان داد که طول دوره لاروی در این حشره افزایش معنی‌داری دارد، و درصد تبدیل شدن به شفیره و حشره کامل کاهش یافت. همچنین در این بررسی مشخص شد که غلظت‌های زیرکشنده *Bt* می‌تواند طول دوره رشدی لاروهای حشره مورد بررسی را افزایش دهد. نتایج این تحقیقات با مشاهدات تحقیق حاضر همخوانی دارد و اثرات زیستی که منجر به کاهش معنی‌داری در ظهور حشرات کامل شد از نتایج قابل توجه پژوهش حاضر می‌باشد.

افزایش اثرات سینرژیستی با افزایش زمان درمعرض قرارگیری نیز در تحقیق حاضر مشاهده شد و پس از ۱۴۴ ساعت بیشترین میزان اثرات در تلفیق‌های بیشتری در مقایسه با ۴۸ ساعت اول ثبت گردید. در بررسی تاثیر تلفیق عصاره‌های گیاهان مختلف با *Bt* علیه کرم برگ‌خوار پنبه، *S. litura*، نتیجه مشابهی گزارش گردید و با افزایش زمان در معرض قرارگیری، مرگ و میر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Rajguru & Sharma, 2012). در تحقیق دیگری تلفیق عصاره آبی چند گیاه در تلفیق با *Bt* علیه *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebinae) بررسی و مشاهده گردید عصاره برخی گیاهان در تلفیق با *Bt*، با گذشت زمان تا ۷۲ ساعت اثر سینرژیستی بر مرگ و میر لاروها داشتند و ترکیباتی نیز اثرات آنتاگونیستی داشته و مرگ و میر کاهش یافته است (Vilani *et al*., 2017)، نتایج این تحقیق نیز از نظر نتایج حاصله با تحقیق حاضر همخوانی دارد.

از مشاهدات مهم تحقیق حاضر، تفاوت در تأثیر کشندگی و زیرکشندگی عصاره‌های مختلفی بود که با استفاده از حلال‌های مختلف تهیه شده بود. به‌طوری‌که عصاره اتیل‌استاتی بهتر از دو عصاره دیگر عمل کرد و عصاره متانولی در مجموع کارایی کمتری در مقایسه با عصاره‌های دیگر از خود نشان داد. گیاهان منابعی غنی از متابولیت‌های مختلف هستند. هر متابولیتی با توجه به ماهیت شیمیایی خود میزان حلالیت متفاوتی در حلال‌های با درجات قطبی مختلف نشان می‌دهد (Lezoul *et al*., 2020;Le *et al*., 2018). اتیل‌استات ماهیت نسبتا قطبی دارد و متانول قطبیت بیشتری در مقایسه با آن دارد و هگزان ترکیب غیرقطبی است (Dirar *et al*., 2019). با توجه به فرایند عصاره‌گیری به‌نظر می‌رسد هر حلال ترکیبی با قطبیت مشابه خود را از مجموع ترکیبات موجود در گیاهان استخراج کند (Lezoul *et al*., 2020). به‌عبارتی با توجه به اثرات بهتر عصاره استخراجی با استفاده از اتیل‌استات این حلال ترکیبات فعال و موثر بر این آفت را به‌میزان بیشتری در مقایسه با سایر حلال‌ها استخراج کرده است. تفاوت در ترکیبات و اثرات عصاره‌های استخراج شده توسط حلال‌های مختلف مشخص شده است (Zhang *et al*., 2022). ترکیبات شیمیایی عمده که از اسانس برگ‌های کرفس بدست آمده است لیمونن و میرسن است که در مجموع بیش از ۸۰ درصد ترکیبات را به خود اختصاص داده‌اند (Kooti *et al*., 2014; Rożek *et al*., 2016). لیمونن به‌عنوان یک ترکیب مؤثر بر رفتار و بیولوژی حشرات مختلف در مطالعات متعددی گزارش شده است (Ibrahim *et al*., 2001; Dekebo *et al*., 2019). لیمونن یک ترپن غیرمحلول در آب است که اثرات تدخینی، گوارشی و مهارکنندگی آن بر سیستم‌های آنزیمی گوارشی در مطالعات مختلف گزارش شده است (Karr & Coats, 1988; Koul *et al*., 2008; Theochari *et al*., 2020; Dolores Ibáñez *et al*., 2020). احتمال تأثیر عصاره اتیل‌استاتی کرفس بر لاروهای بید سیب‌زمینی را می‌توان به حضور این ترکیبات نسبت داد.

در مجموع با توجه به اثرات کشندگی و زیرکشندگی تلفیق عصاره‌های مختلف کرفس با حشره‌کش میکروبی *Bt*، با مطالعات تکمیلی می‌توان از این تلفیق در مدیریت بید سیب‌زمینی استفاده کرد. با توجه به امنیت نسبی و اثرات سینرژیستی مشاهده شده، عصاره کرفس از پتانسیل لازم برای این امر برخوردار است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته حشره‌شناسی کشاورزی است که با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان انجام گرفته است که بدین وسیله از همکاری معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از

آزمایشگاه فیتوشیمی گروه شیمی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای در اختیار گذاشتن امکانات لازم بـرای عصـاره‌گیـری و آنـالیز داده‌هـا تقدیر و تشکر می‌شود.

Refrences

1. Abedi, Z., Saber, M., Vojoudi, S., Mahdavi, V., & Parsaeyan, E. (2014). Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*, *14*, 30. https://doi.org/10.1093/jis/14.1.30
2. Aghaali, N., Ghadamyari, M., Hosseininaveh, V., & Saberi Riseh, N. (2013). Protease inhibitor from the crude extract of plant seeds affects the digestive proteases in *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). *Journal of Plant Protection Research*, *53*(4), 338-346. https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0051
3. Ali, K., Sagheer, M., ul Hasan, M., Rashid, A. & Shahid, M. (2021). Bioactivity of medicinal plant extracts as toxicants and enzyme inhibitors against insect pests of stored commodities. *Journal of Crop Protection*, *10*(1), 95-109. https://doi.org/20.1001.1.22519041.2021.10.1.11.5
4. Allahverdizadeh, N.M., & Mohammadi, D. (2016). Bioactivity of *Marrubium vulgare* and *Achillea millefolium* leaf extracts on potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller. *Munis Entomology and Zoology*, *11*(1), 114-122.
5. Alvarez, J.M., Dotseth, E., & Nolte, P. (2005). *Potato tuber worm: a threat for Idaho potatoes*. University of Idaho Experiment Station Bulletine, CIS1125 1-4.
6. Alves, T.J.S., Cruz, G.S., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Oliveira, J.V., Correia, A.A., Câmara, A.A.G., & Cunha, F.M. (2013). Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotechnic and Histochemistry*, *88*, 1–11. https://doi.org/10.3109/10520295.2013.837509
7. Bernfeld, P. (1955) Amylase α and β. *Methods in Enzymology*, *1*, 149-158. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5
8. Candido, L.P., Cavalcanti, M.T., & Beserra, E.B. (2013). Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidea). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *46*(4), 420-425. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0118-2013
9. Capinera, J.L. (2020). *Handbook of vegetable pests*. Academic Press, New York.
10. Da Lage, J-L. (2018). The amylases of insects. *International Journal of Insect Science*, *10*, 1–14. https://doi.org/10.1177/1179543318804783
11. de França, S.M., Breda, M.O., Barbosa, D.R.S., Araujo, A.M.N., & Guedes, C.A. (2017). The sublethal effects of insecticides in insects. In: Shields, V.D.C. (Ed.), *Biological Control of Pest and Vector Insects*, Intech Open. https://doi.org/10.5772/66461
12. Dekebo, A., Aryal, S., & Jung, C. (2019). Olfactory responses of adult potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) measured by attraction relative to the tomato leaf volatiles. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *22*, 611–618. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.007
13. Dirar, A.I., Alsaadi, D.H.M., Wada, M., Mohamed, M.A., Watanabe, T., & Devkota, H.P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, *120*, 261-267. https://doi.org/10.3390/agriculture12111820
14. Dogramaci, M., & Tingey, W. (2008). Comparison of insecticide resistance in a North American field population and a laboratory colony of potato tuber worm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science*, *81*, 17-22. https://doi.org/10.1007/s10340-007-0178-5
15. Dolores Ibáñez, M., Sanchez-Ballester, N.M., & Amparo Blázquez, M. (2020). Encapsulated limonene: a pleasant lemon-like aroma with promising application in the agri-food industry. A review. *Molecules*, *25*, 1-20. https://doi.org/10.3390/molecules25112598
16. El-kady, H. (2011). Insecticide resistance in potato tuber moth *Phthorimaea Operculella* Zeller in Egypt. *Journal of American Science*, *7*(10), 263-266.
17. El-Wakeil, N.E. (2013). Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, *65*, 125–149. https://doi.org/10.1007/s10343-013-0308-3
18. Fouad Sharaby, A.M., Gesraha, M.A., & Baker Fallatah, S.A. (2019). Integration of some biopesticides against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zell.), during storage with reference to histopathological changes detected by a transmission electron microscope in the endocrine system. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*, 1-16. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0163-1
19. Gujar, G.T., Kalia, V., Kumari, A., & Prasad, T.V. (2004). Potentiation of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 by proteinase inhibitors in the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Indian Journal of Experimental Biology*, *42*, 157-163.
20. Handa, S.S., Singh Khanuja, S.P., Longo, G., & Rakesh, D.D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. International center for science and high technology, 260 P.

21. Hatami, A., Mohammadi, D., & Eivazian Kary, N. (2022). Comparing oral toxicity of *Apium graveolens* and *Falcaria vulgaris* extracts with Bt against *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Journal of Applied Research in Plant Protection, 11*(3), 17-29. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22034/ARPP.2022.15186
22. Hussain Shah, T. (2017). Plant nutrients and insect's development. *International Journal of Entomology Research, 2*(6), 54-57.
23. Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkata, K., & Holopainen, J.K. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*, *10*, 243-259. https://doi.org/10.23986/afsci.5697
24. Isman, M.B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century–fulfilling their promise? *Annual Review Entomology*, *65*, 233–249. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010
25. Jung, J-M., Lee, S-G., Kim, K.H., Jeon, S.W., Jung, S., & Lee, W.H. (2019). The potential distribution of the potato tuber moth (*Phthorimaea Operculella*) based on climate and host availability of potato. *Agronomy*, *10*, 12. https://doi.org/10.3390/agronomy10010012
26. Karr, L.L., & Coats, J.R. (1988). Insecticidal properties of d-limonene. *Journal of Pesticide Science*, *13*, 2287–2290. https://doi.org/10.1584/jpestics.13.287
27. Khalil, A., Nawaz, H., Ghania, JB., Rehman, R., & Nadeem, F. (2015). Value added products, chemical constituents and medicinal uses of celery (*Apium graveolens* L.) – a review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, *8*, 40-48.
28. Khan, S., Nazir Uddin, M., Rizwan, M., Khan, W., Farooq, M., Shah, A., Subhan, F., Aziz, F., Ur Rahman, K., Khan, A., Ali, S., & Muhammad, M. (2020). Mechanism of insecticide resistance in insects/pests. *Polish Journal of Environmental Studies*, *29*(3), 2023–2030. https://doi.org/10.15244/pjoes/108513
29. Khorrami, F., & Soleymanzade, A. (2021). Efficacy of some chemical insecticides and plant extracts combined with *Bacillus thuringiensis* against *Phthorimaea operculella*. *Acta phytopathologica et entomologica Hungarica*, *56*(2), 169-179. https://doi.org/10.1556/038.2021.00119
30. Konecka, E., Kaznowski, A., Grzesiek, W., Nowicki, P., Czarniewska, E., & Baranek, J. (2020). Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*. *BioControl, 65*, 447–460. https://doi.org/10.1007/s10526-020-10011-4
31. Kooti, W., Ali-Akbari, S., Asadi-Samani, M., Ghadery, H., & Ashtary-Larky, D. (2014). A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Advanced Herbal Medicine*, *1*(1), 48-59.
32. Koppenhöfer, A.M., & Kaya, H.K. (1997). Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. *Journal of Economic Entomology, 91*, 618–623. https://doi.org/10.1093/jee/91.3.618
33. Koul, O., Walia, S., & Dhliwal, G. (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, *4*(1), 63-84.
34. Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P., & Govindan, N., (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *24*(4), 473-84. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013
35. Le, A.V., Parks, S.E., Nguyen, M.H., & Roach, P.D. (2018). Effect of solvents and extraction methods on recovery of bioactive compounds from defatted gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) seeds. *Separations*, *5*, 39. https://doi.org/10.3390/separations5030039
36. Lee, C.Y. (2000). Sublethal effects of insecticide on longevity, fecundity, and behavior of insect pests: a review. *Bioscience Journal*, *11*, 107–112. https://doi.org/10.5772/66461
37. Lezoul, N.H., Belkadi, M., Habibi, F., & Guillén, F. (2020). Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. *Molecules*, *25*, 4672. https://doi.org/10.3390/molecules25204672
38. Madasamy, M., Sahayaraj, K., Sayed, S.M., Al-Shuraym, L.A., Selvaraj, P., El-Arnaouty, S.A. & Madasamy, K. (2023). Insecticidal mechanism of botanical crude extracts and their silver nanoliquids on *Phenacoccus solenopsis*. Toxics, *11*, 305. https://doi.org/10.3390/toxics11040305
39. Magholi Fard, Z., Hesami, S., Marzban, R., & Salehi Jouzani, G. (2020). Individual and combined biological effects of *Bacillus thuringiensis* and multicapsid Nucleopolyhedrovirus on the biological stages of egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (B.) (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agricultural Science Technology*, *22*(2), 465-476. https://doi.org/20.1001.1.16807073.2020.22.2.13.1
40. Malik, K., & Riasat, R. (2014). Study of combined effect of locally isolated *Bacillus thuringiensis* and turmeric powder on red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, *3*, 760–77. https://doi.org/10.5829/idosi.aje.2015.8.1.9244
41. Mehrabadi, M., Bandani, A.R., & Alizadeh, H. (2012). Inhibitory activity of proteinaceous alpha- amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary alpha-amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *102*, 220-228. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.01.008

42. Mesén-Porras, E., Dahdouh-Cabia, S., Jimenez-Quiros,c., Mora-Castro, R., Rodríguez, C., & Pinto-Tomás, A. (2020). Soybean protease inhibitors increase *Bacillus thuringiensis* subs. Israelensis toxicity against *Hypothenemus hampei*. *Agronomía Mesoamericana*, *31*(2),461-478. https://doi.org/10.15517/am.v31i2.36573
43. Mohammadi, D., Eivazian Kary, N., & Sharifi Azar, Z. (2020). Enhancing Efficiency of *Bacillus thuringiensis* by Leaf Extract of *Cupressus arizonica* against *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *9*(1), 89-105. (In Persian with English abstract)
44. Nazarpour, L., Yarahmadi, F., Saber, M., & Rajabpour, A. (2016). Short and long term effects of some bio-insecticides on *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) and its coexisting generalist predators in tomato fields. *Journal of Crop Protection*, *5*(3), 331-342. https://doi.org/20.1001.1.22519041.2016.5.3.7.0
45. Ngegba, P.M., Cui, G., Khalid, M.Z., & Zhong, G. (2022). Use of botanical pesticides in agriculture as an alternative to synthetic pesticides. *Agriculture*, *12*(5), 600. https://doi.org/10.3390/agriculture12050600
46. Nouri-Ganbalani, G., Borzoui, E., Abdolmaleki, A., Abedi, Z., & George Kamita, S. (2016). Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and *Azadirachtin* on *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Science*, *16*(1), 95. https://doi.org/10.1093/jisesa/iew086. PMID: 27638953
47. Opender, K., & Walia, S. (2009). *Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control*. Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4, 1-30. https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20094049
48. Plata-Rueda, A., Quintero, H.A., Serrão, J.E., & Martínez, L.C. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains on the nettle caterpillar, *Euprosterna elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae). *Insects*, *11*, 310. https://doi.org/10.3390/insects11050310
49. Qi, X.-J., Feng, Y.X., Pang, X., & Du, S.S. (2021). Insecticidal and repellent activities of essential oils from seed and root of celery (*Apium graveolens* L.) against three stored product insects. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *24*(5), 1169-1179, https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1981159
50. Rajguru, M., & Sharma, A.N. (2012). Comparative efficacy of plant extracts alone and in combination with *Bacillus thuringiensis* sub sp. kurstaki against *Spodoptera litura* Fab. larvae. *Journal of Biopesticides*, *5*(1), 81-86.
51. Rajguru, M., Sharma, A., & Banerjee, S. (2011). Assessment of plant extracts fortified with *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) for management of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, *31*(1-2), 92-97. https://doi.org/10.1017/S174275841100018X
52. Reddy, D.S., & Chowdary, N.M. (2021). Botanical biopesticide combination concept- a viable option for pest management in organic farming. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*, 1-10. https://doi.org/10.1186/s41938-021-00366-w
53. Rondon, S.I. (2010). The potato tuberworm: a literature review of its biology, ecology, and control. *American Journal of Potato Research*, *87*, 149–166. https://doi.org/10.1007/s12230-009-9123-x
54. Rożek, E., Nurzyńska-Wierdak, R., Sałata, A., & Gumiela P. (2016). The chemical composition of the essential oil of leaf celery (*Apium graveolensl*. var. Secalinum Alef.) under the plants' irrigation and harvesting method. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, *15*(1), 147-157.
55. Sánchez–Yáñez, J.M., Rico, J.L., & Ulíbarri, G. (2022). *Bacillus thuringiensis* (Bt) is more than a special agent for biological control of pests. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, *9*(2), 33–39. https://doi.org/10.15406/jabb.2022.09.00282
56. Schoor, T.V., Kelly, E.T., Tam, N., & Michael Attardo, G. (2020). Impacts of dietary nutritional composition on larval development and adult body composition in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Insects*, *11*, 535. https://doi.org/10.3390/insects11080535
57. Senthil-Nathan, S., Kandaswamy, K., Kim, S., & Kadarkarai, M. (2006). The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaf-folder. *Chemosphere*, *62*, 1381-7. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.051
58. Silva, C.T.S., Wanderley-Teixeira, V., Cunha, F.M., Oliveira, J.V., Dutra, K.A., Navarro, D.M.A.F., & Teixeira, A.A.C. (2016). Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* treated with citronella oil (*Cymbopogon wintwrianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochemistry*, *118*, 347–352. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.03.004
59. Singh Rattan, R. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, *29*(9), 913-920. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008
60. Stark, J.D., & Banks, J.E. (2003). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, *48*, 505–519. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112621
61. Sun, J., Feng, Y., Wang, Y., Li, J., Zou, K., Liu, H., Hu, Y., Xue, Y., Yang, L., Shushan, Du, S., & Wu, Y. (2020). Investigation of pesticidal effects of *Peucedanum terebinthinaceum* essential oil on three stored-product insects. *Records of Natural Products*, *14*(3), 177-189.
62. Talaei-Hassanloui, R., Bakhshaei, R., Hosseininaveh, V., & Khorramnezhad, A. (2014). Effect of midgut proteolytic activity on susceptibility of lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki. *Frontiers in Physiology*, *4*, 406. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00406

63. Theochari, I., Giatropoulos, A., Papadimitriou, V., Karras, V., Balatsos, G., Papachristos, D., & Michaelakis, A. (2020). Physicochemical characteristics of four limonene-based nanoemulsions and their larvicidal properties against two mosquito species, *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* molestus. *Insects*, *11*, 1-12. https://doi.org/10.3390/insects11110740
64. Vilani, A., Lozano, E.R., Potrich, M., Angeli, A., Luis, F., Martins, C.M.F., Dall Agnol de Lima, J., & de Gouvea, A. (2017). Activity of plant aqueous extracts on *Bacillus thuringiensis* and their interactions on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebinae). *Semina: Ciências Agrárias*, *38*(2), 1051-1057. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n2p1051
65. Visweshwar, R., Akbar, S.M.D., Sharma, H.C., & Sreeramulu, K. (2018). Influence of *Bacillus thuringiensis* toxins on the development and midgut proteases in different larval instars of *Helicoverpa armigera. Indian Journal of Entomology*, *80*(3), 960-970.
66. Yang, J., Quan, Y., Sivaprasath, P., Shabbir, M.Z., Wang, Z., Ferré, J., & He, K. (2018). Insecticidal activity and synergistic combinations of ten different Bt toxins against *Mythimna separata* (Walker). *Toxins*, (Basel), *4;10*(11): 454. https://doi.org/10.3390/toxins10110454
67. Yazdani, E., JalaliSendia, J., Zibaeea, A., & Ghadamyari, M. (2010). Enzymatic properties of *α*-amylase in the midgut and the salivary glands of mulberry moth, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*, *333*(1), 17-22.
68. Yildirim, E., Emsen, B., & Kordali, S. (2013). Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *86*, 198-204.
69. Zhang, C., Yu, J., Tu, Q., Yan, F., Hu, Z., Zhang, Y., & Song, C. (2022). Antioxidant capacities and enzymatic inhibitory effects of different solvent fractions and major flavones from celery seeds produced in different geographic areas in China. *Antioxidants*, *11*, 1542. https://doi.org/10.3390/antiox11081542
70. Zhu, F., Lavine, L., O’Neal, S., Lavine, M., Foss, C., & Walsh, D. (2016). Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects*, *7*, 2. https://doi.org/10.3390/insects7010002